Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 4, Oct- Nov 2017, p. 517-527

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 4، مهر- آبان 1396، ص. 527-517

اثر حلال‌های مختلف و امواج فراصوت بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه زغال اخته

فروغ گیلانی[1]- زینب رفتنی امیری[2]*- رضا اسماعیل‌زاده کناری[2]

تاریخ دریافت: 1394/11/20
تاریخ پذیرش: 1394/04/19

چکیده

میوه زغال اخته به دلیل داشتن ترکیبات ارزشمند فراوانی مانند ترکیبات فنولی، منبع خوبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و می‌تواند به‌عنوان گیاه دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه، تاثیر روش‌های استخراج (غرقابی و اولتراسوند) و حلال (اتانول100%، آب- اتانول به نسبت 50:50 حجمی-حجمی و آب) بر میزان ترکیبات فنولی استخراجی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه زغال اخته مورد بررسی قرار گرفت. محتوای فنول کل عصاره‌ها با روش فولین سیوکالتیو تعیین شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از سنجش قدرت احیاکنندگی آهن III و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که نوع حلال و روش استخراج بر مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها تاثیر گذار بوده است و همچنین وابستگی غلظت ترکیبات فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در همه عصاره‌ها مشاهده شد. بالاترین مقدار ترکیبات فنولی با 142/72 میلی‌گرم بر گرم (برحسب اسید گالیک) متعلق به عصاره میوه زغال اخته حاصل از حلال آب- اتانول (50:50 حجمی/ حجمی) به کمک روش اولتراسوند بوده است. هم چنین این عصاره با کمترین IC50 با مقدار 0/955 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و بالاترین جذب با مقدار 0/601 در آزمون قدرت احیاکنندگی آهن III، بالاترین کارایی آنتی‌اکسیدانی را نشان داده است.

واژه‌های کلیدی: میوه زغال اخته، غرقابی، اولتراسوند، حلال، خواص آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

میوه‌ها و سبزی‌ها، منابع خوبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فنول‌ها به‌عنوان گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه جدا شده از گیاهان شناخته شده اند (Pawlowska *et al*., 2010; Stankovic *et al*., 2014). رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا گروهی از اتم‌ها هستند که حداقل یک الکترون جفت نشده دارند و همین عامل، آن‌ها را بسیار واکنش‌پذیر ساخته است. آنتی‌اکسیدان‌ها با دادن یک الکترون به رادیکال آزاد، آن‌ها را غیرفعال نموده و از تاثیرات منفی آن‌ها جلوگیری می‌کند و به این ترتیب موجب به تعویق انداختن واکنش اکسیداسیون، به حداقل رساندن فساد مواد غذایی، حفظ کیفیت تغذیه‌ای و افزایش عمر نگهداری می‌شود (Stankovic *et al*., 2014; Sushma *et al*., 2014). زغال اخته با نام علمی (*Cornus mas* L.)، یک گیاه وحشی است که به‌طور گسترده در آسیا و اروپا رشد می‌کند (Karasakal, 2015). محل رویش این میوه در ایران در مناطقی مانند قزوین و ارسباران است (Hassanpour *et al*., 2011). میوه رسیده زغال اخته به رنگ قرمز و ترش مزه است (Karasakal, 2015). این میوه دارای خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است و به‌عنوان داروی گیاهی در طب مورد استفاده قرار می‌گیرد (Stankovic *et al*., 2014). میوه تازه زغال اخته، دارای مقادیر بالای مواد معدنی مانند آهن و کلسیم است. میوه تازه آن همچنین دارای مقادیر بالای ویتامین‌های دیگری مانند آلفا توکوفرول، بیوتین و ریبوفلاوین است (Narimani-Rad *et al*., 2013). Tural و همکاران (2008)، در پژوهشی با بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی میوه زغال اخته بیان نمودند که این میوه غنی از ترکیبات فنولی، آنتوسیانین و اسید آسکوربیک است. استخراج مواد گیاهی با روش غرقابی به‌وسیله استفاده از حلال‌های شیمیایی انجام می‌شود و بازده عصاره به نوع حلال بستگی دارد (Sushma *et al*., 2014). زمان طولانی استخراج و مصرف بالای حلال و مقدار بازده پایین از معایب روش استخراج غرقابی است (Karasakal, 2015). در سال های اخیر، اولتراسوند به‌عنوان یک روش جدید برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد که نسبت به روش غرقابی، موجب افزایش مقدار بازده در زمان کوتاهتر استخراج می‌گردد (Rouhani *et al*., 2014). بهبود روش

1 و 2- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی،دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی ساری، مازندران
(* - نویسنده مسئول: Email: zramiri@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.53710

استخراج حلالی مواد گیاهی به‌وسیله اولتراسوند اساساً به علت تاثیرات مکانیسم پدیده کاویتاسیون است که با شکستن دیواره سلولی، انتقال جرم و نفوذ حلال را به مواد گیاهی افزایش می‌دهد(Rouhani *et al.,* 2014). هدف از این پژوهش، تاثیر امواج فراصوت و حلال‌های مختلف استخراج بر میزان ترکیبات فنولی استخراج شده و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از میوه زغال اخته می باشد.

مواد وروش‌ها

مواد

الکل اتانول100%، معرف فولین‌سیوکالتیو و تری‌کلرواستیک اسید ساخت شرکت مرک و بافر سدیم فسفات (PH=6/6)، فری سیانیدپتاسیم و فریک کلراید ساخت شرکت سیگما آلدریچ مورد استفاده قرار گرفت

آماده سازی نمونه

میوه زغال اخته متعلق به منطقه قزوین، از بازار محلی شهرستان آمل به‌صورت تازه در شهریور 1393 تهیه گردید. سپس بعد از تمیز کردن، شستشو و جدا کردن هسته از میوه، بر روی پارچه و در مقابل نور آفتاب به مدت 5 روز خشک گردید. میوه خشک شده با آسیاب الکتریکی (مدلmoulinex type 719، فرانسه) پودر و درکیسه‌های نایلونی در فریزر 18- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

استخراج عصاره با روش حلالی (غرقابی)

استخراج ترکیبات فنولی به روش غرقابی با استفاده از روش Esmaeilzadeh Kenari و همکاران(2014) انجام شد. حلال انتخابی(آب مقطر، اتانول و آب-اتانول با نسبت50:50 حجمی/ حجمی(V/V)) برای عملیات استخراج به روش غرقابی در دمای محیط منظورشد. مقدار 10 گرم نمونه پودر میوه زغال اخته را با نسبت 1 به 10 وزنی/ حجمی(W/V)، با 100 میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌ها مخلوط گردید. مخلوط هر نمونه و حلال به مدت 24 ساعت در دمای اتاق روی شیکر (Fan Azma Gostar) با سرعت 140 دور دردقیقه (rpm) قرار داده شد پس از آن مخلوط حاصل با استفاده از پمپ خلا و قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره 42 صاف گردید، در پلیت ریخته شد و در آون با دمای 55 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره کاملا خشک و عاری از حلال شود. سپس عصاره‌های استخراجی حاصل تا زمان انجام آزمایشات بعدی در فریزر 18- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

استخراج عصاره با روش اولتراسوند

استخراج ترکیبات فنولی به روش اولتراسوند با استفاده از روش Goli و همکاران (2005) انجام شد. عصاره مطابق مراحل استخراج غرقابی تهیه گردید با این تفاوت که مخلوط نمونه وحلال در معرض امواج فراصوت با فرکانس 37 کیلوهرتز در دمای 3±35 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 دقیقه در حمام اولتراسوند (مدل S30H Elma، آلمان) قرار گرفت و برای جلوگیری از افزایش دما، از گردش آب سرد در مدت زمان استخراج استفاده شد.

ترکیبات فنولی

میزان کل ترکیبات فنولی عصاره میوه زغال اخته با استفاده از معرف فولین‌سیوکالتیو و مطابق روشEsmaeilzadeh Kenari و همکاران (2014) انجام شد. برای این منظور به 0/5 میلی‌لیتر عصاره، 2/5 میلی‌لیترمعرف (نسبت 1 به 10 با آب مقطر رقیق شده بود) و 2 میلی‌لیتر سدیم کربنات 7/5 درصد اضافه کرده و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری و با استفاده ازدستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو uv,vis 2100) جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج 760 نانومتر قرائت شد. غلظت ترکیبات فنولی بر حسب اسید گالیک با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با معادله (1) و $R^2= 0/9903$ محاسبه شد که y میزان جذب خوانده شده در طول موج 760 نانومتر و X غلظت فنول بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

$$y = 0/0494 + 1/6507X \qquad (1)$$

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال های آزاد DPPH

توانایی مهار رادیکال آزاد 2,2′-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical مطابق روش Esmaeilzadeh Kenari و همکاران (2014) انجام شد. ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (3000-500 میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌ها آماده شدند. سپس0/3 میلی‌لیتر از عصاره را با 2/7 میلی‌لیتر از محلول متانولیDPPH (با غلظت 6×10^{-5} مولار) به شدت مخلوط کرده و به مدت 60 دقیقه در مکانی تاریک نگهداری کرده و جذب آن در طول موج 517 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو uv,vis 2100) خوانده شد. در نهایت درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد.

(2) ((جذب DPPH - جذب نمونه)/ جذب DPPH) ×100 = درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

ارزیابی قدرت احیا کنندگی آهن III

اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی با استفاده از روش به‌کار گرفته توسط Farhoosh و همکاران (2007) انجام شد. ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف (3000-500 میکروگرم در میلی‌لیتر) از عصاره‌ها تهیه گردید. 1 میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف محلول عصاره را در لوله‌های فلکون جداگانه با 2/5 میلی‌لیتر بافر فسفات (0/2 مولار با

(pH = 6/6) مخلوط کرده و به آن مقدار 2/5میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم (1% وزنی/ حجمی) اضافه کرده و به مدت 30 دقیقه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری نموده و سپس به آن، 2/5 میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (10% وزنی/ جمی) افزوده و آن گاه با استفاده از سانتریفوژ با دور g 1000، به مدت 10 دقیقه مخلوط را سانتریفوژ کرده و سپس از فاز فوقانی مقدار 2/5 میلی‌لیتر برداشته و با 2/5 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر کلریدآهنIII (0/1% وزنی/ ججمی) مخلوط کرده آن گاه جذب محلول بدست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو uv,vis 2100) در طول موج 700 نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

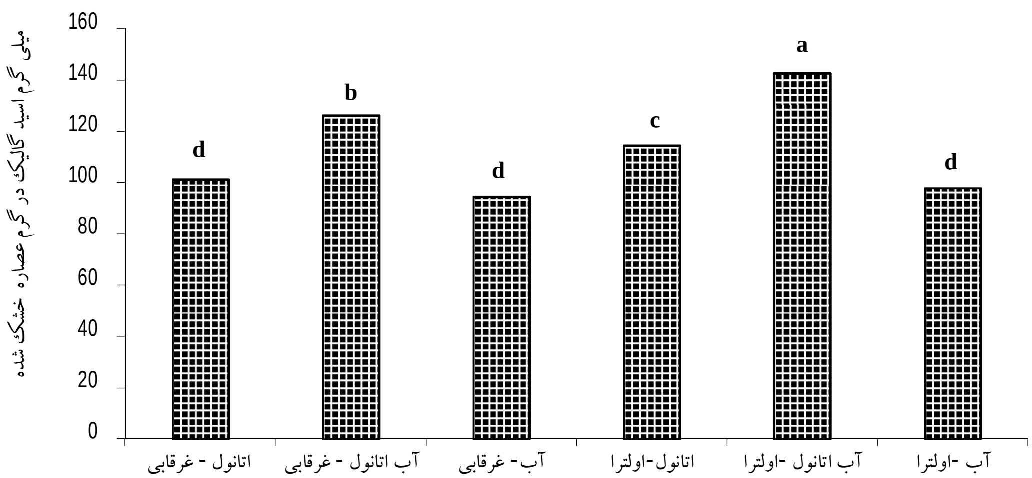
بررسی اثر روش استخراج اولتراسوند و غرقابی به کمک حلال‌های مختلف (آب، اتانول و آب- اتانول) بر میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، بر پایه طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح معنی‌داری 5 % صورت گرفت. آنالیز کلیه داده‌ها با نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنولی

شکل 1 مقایسه میانگین مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع حلال و روش استخراج، تاثیر معنی‌داری ($P < 0/05$) بر مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها دارد. با توجه به شکل 1، بیشترین مقدار ترکیبات فنولی متعلق به حلال آب- اتانول (50:50) به کمک روش اولتراسوند می‌باشد. همچنین با توجه به شکل 1، ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌های آبی کمتر از عصاره‌های الکلی و عصاره‌های حاصل از روش اولتراسوند نسبت به غرقابی بالاتر می‌باشد. پدیده کاویتاسیون تولید شده در حلال در طی فرآیند استخراج به وسیله اولتراسوند می‌تواند موجب افزایش مقدار استخراج ترکیبات فنولی نسبت به روش غرقابی گردد که ویژگی‌های حلال مانند فشار بخار، کشش سطحی و ویسکوزیته می‌توانند روی شدت کاویتاسیون ایجاد شده تاثیرگذار باشد. تاثیر فشار بخار در اولتراسوند می‌تواند به تولید حباب‌های کاویتاسیون بستگی داشته باشد. بدین صورت که حلال‌هایی با فشار بخار پایین‌تر، تعداد اندکی حباب‌های کاویتاسیون را تولید کرده که به انرژی بالاتر برای فروپاشی نیاز دارند بنابراین در طول فرآیند استخراج، بافت گیاهی با شدت بیشتری تخریب می‌شود. در مورد ویژگی ویسکوزیته حلال، هرچه مقدار آن، پایین‌تر باشد موثرتر است زیرا انرژی اولتراسونیک آسان تر بر نیروی بین مولکولی مایع با ویسکوزیته پایین غلبه می‌کند و همچنین به علت چگالی پایین و ضریب پخش بالا در حلال با ویسکوزیته پایین، به آسانی به بافت‌های گیاهی نفوذ می‌کند. کشش سطحی حلال ویژگی دیگر تاثیرگذار است که در حلال با کشش سطحی پایین، انرژی اولتراسونیک به‌کار برده شده می‌تواند به آسانی کشش سطحی را افزایش داده و در نتیجه حباب‌های کاویتاسیون آسان‌تر ایجاد می‌شود (Ghasemzadeh *et al*., 2015). در مورد حلال‌های به‌کار رفته در آزمایش، با توجه به این که اتانول دارای ویسکوزیته و فشار بخار بالاتر و کشش سطحی پایین‌تر (به‌ترتیب cp 1/2، 59/02 mmHg و 23/78 mN/cm) نسبت به آب (به‌ترتیب cp 0/89، 23/8 mmHg و 72/8 mN/cm) است. بنابراین ترکیب حلال آب- اتانول می تواند با داشتن هر دو ویژگی موثرتر عمل می‌کند. فنول‌ها ترکیباتی هستند که شامل یک یا بیشتر گروه هیدروکسیل (بخش قطبی) است که به یک حلقه آروماتیک (بخش غیرقطبی) متصل شده‌اند که این ساختمان فضایی، فنول‌ها را مطابق با قطبیتشان متمایز می‌کند بنابراین حلالیت فنول‌ها در حلال، می‌تواند به‌وسیله این ساختمان فضایی (بخش قطبی و غیرقطبی در مولکول‌های آن) و نیروی بین مولکولی (اساسا پیوند هیدروژنی) که بین آن‌ها با حلال ایجاد می‌شود توضیح داده شود(Galanakis *et al*., 2013). استفاده از آب به‌عنوان حلال استخراج، یک محیط بسیار قطبی ایجاد می کند که برای استخراج ترکیبات بیواکتیو با قطبیت زیاد مناسب است در حالی که آب- اتانول یا اتانول برای استخراج ترکیبات بیواکتیو با رنج وسیعی از قطبیت مناسب است که این به علت وجود محیط نسبتاً قطبی است که در اثر افزودن آب به حلال آلی، ایجاد می‌گردد (Sun *et al*., 2015). از طرف دیگر برای تورم مواد سلولی، آب مورد نیاز است بنابراین با حضور مقادیر مناسب آب در حلال آلی، نفوذپذیری دیواره سلولی افزایش می‌یابد و می‌توانند به آسانی به محض فرآیند اولتراسوند شکسته شود اما در اتانول مطلق (100%)، هیچ آب در دسترسی برای تورم سلول‌ها وجود ندارد بنابراین ترکیب این 2 حلال (غلظت 50% آب- اتانول)، بهینه و موثر خواهد بود (Charpe *et al*., 2014). گزارش شده است که حلال‌های اتانول و متانول به‌صورت مخلوط با آب توانایی بیشتری به علت قطبیت بالاتر نسبت به حلال خالص الکلی خود در استخراج ترکیبات فنولی دارند (Sultana *et al*., 2009). در این مطالعه، آب با وجود قطبیت بالا نسبت به حلال‌های آب- اتانول و اتانول توانایی کمی در استخراج ترکیبات فنولی نشان داد. آب در طی فرآیند استخراج احتمالا، با حل کردن پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و دیگر ترکیبات قطبی، موجب کاهش خلوص عصاره و بازده پایین ترکیبات فنولی شده است. از طرفی این نتیجه احتمالا به دلیل ماهیت نیمه قطبی و قطبیت کمتر ترکیبات فنولی میوه زغال اخته بوده که به مقدار کمتری در آب حل گردیده است. در پژوهشی که توسط Ghasemzadeh و همکاران

(2015)، بر روی عصاره سبوس برنج انجام شد بیشترین مقدار ترکیبات فنولی 288/40 میلی‌گرم اسید گالیک در 100گرم ماده خشک مربوط به عصاره استخراجی با روش اولتراسوند، آب- اتانول (50:50) نسبت به روش غرقابی،آب- اتانول (50:50) با مقدار 270/51 میلی‌گرم اسید گالیک در 100گرم ماده خشک گزارش کردند که این مقادیر به‌ترتیب از روش اولتراسوند، اتانول و غرقابی،اتانول بالاتر بوده است که از نظر میزان فنول استخراج شده با یافته‌های این پژوهش متفاوت اما از لحاظ روش‌ها و حلال‌ها در استخراج ترکیبات فنولی نسبت به یکدیگر با این مطالعه مطابقت دارد. در گزارشی توسط Nazir و همکاران (2013) بر روی مقدار ترکیبات فنولی خرمالو با حلال‌های مختلف، بالاتر بودن مقدار ترکیبات فنولی عصاره آب- اتانول خرمالو به‌ترتیب نسبت به عصاره اتانولی و آبی را، توانایی آب– اتانول برای حلالیت بیشتر ترکیبات فنولی موجود در این میوه دانستند که مشابه نتایج این پژوهش می‌باشد.

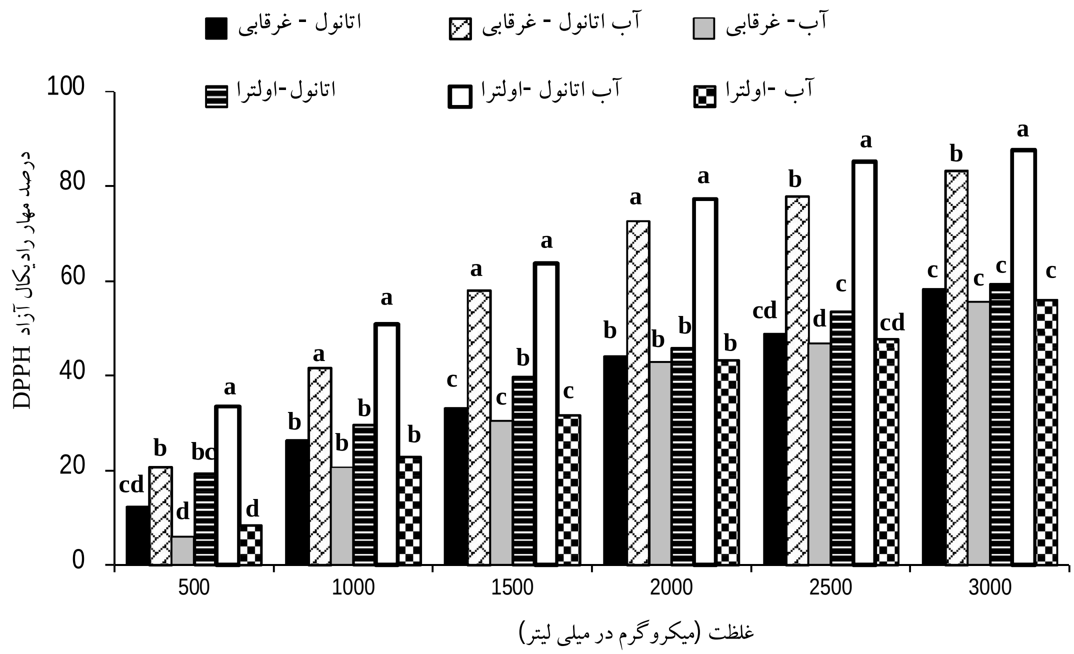


شکل1- مقایسه میانگین ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج.
حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 5% است.

توانایی مهار رادیکال DPPH

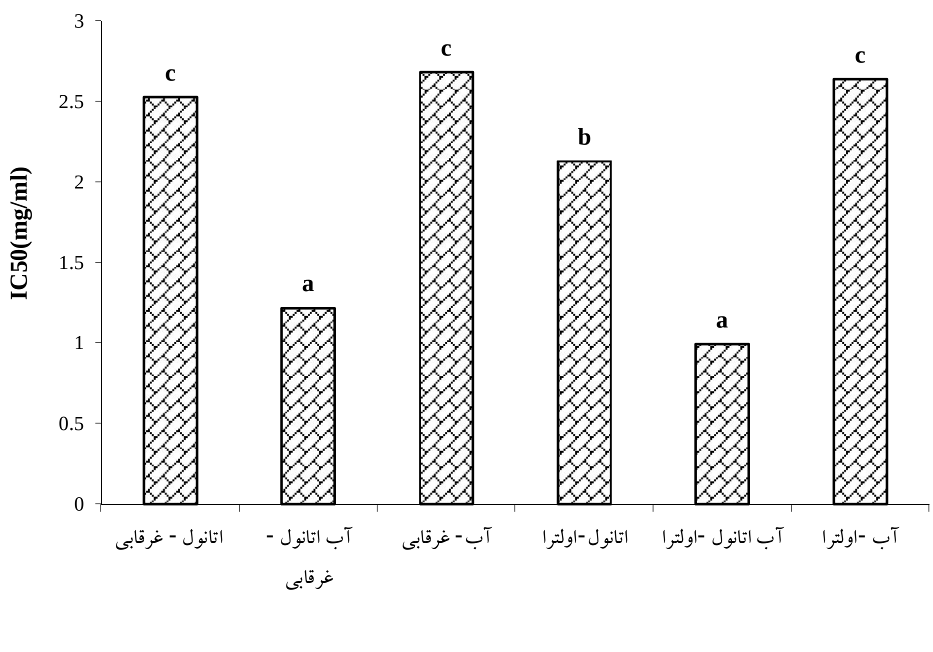
آزمون مهارکنندگی رادیکال DPPH، یکی از روش‌های مهم و نسبتا سریع که مقدار توانایی عصاره را برای اهداء هیدروژن یا برای مهارکنندگی رادیکال آزاد می‌سنجد. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که دارای ماکسیمم جذب در طول موج517 نانومتر است. در اثر واکنش DPPH با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی یا ترکیبات‌دهنده هیدروژن، کاهش در جذب آن اتفاق می‌افتد که به‌صورت تغییر رنگ از بنفش به زرد قابل مشاهده است (Ramazan *et al*., 2011; Ansari *et al*., 2013). شکل 2 فعالیت بازدارندگی عصاره حاصل از روش‌ها، حلال‌ها و غلظت‌های مختلف استخراج را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که نوع و غلظت عصاره‌ها تاثیر معنی‌داری (P< 0/05) بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشتند. همانطور که در شکل 3 مشاهده می‌شود با افزایش غلظت در همه عصاره‌ها، میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد افزایش می‌یابد که به‌علت افزایش مقدار ترکیبات فنولی در غلظت بالاتر عصاره است. توانایی مهارکنندگی ترکیبات فنولی روی رادیکال‌های آزاد به علت گروه هیدروکسیل آن‌ها است که با افزایش غلظت ترکیبات فنولی، تعداد گروه‌های هیدروکسیل در محیط واکنش افزایش یافته و در نتیجه احتمال اهدای هیدروژن به رادیکال آزاد DPPH و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Stankovic *et al*., 2011; Delfanian *et al*., 2015). مطابق شکل 2، بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، متعلق به عصاره حاصل از روش اولتراسوند به کمک حلال آب- اتانول(50:50) بوده که بالاترین مقدار ترکیبات فنولی را داشته است و کمترین درصد مهار مربوط به عصاره‌های آبی است. مقدار IC50 محاسبه شده برای عصاره‌های استخراجی نیز نشان داد که اختلاف آماری معنادار (P<0/05) با یکدیگر دارند و کمترین IC50 با مقدار 0/955 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به عصاره استخراجی با روش اولتراسوند به کمک حلال آب- اتانول (50:50) بوده که نشان‌دهنده کارایی آنتی‌اکسیدانی بالاتر این عصاره می‌باشد

بدین معنا که در غلظت پایین‌تری، توانایی مهار 50% رادیکـال‌هـای DPPH را دارد(شکل3).



شکل2- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH غلظت‌های مختلف عصاره‌های مختلف حاصل از حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج.

حروف غیرمشابه در هر غلظت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 5% است.



شکل3- IC50 عصاره میوه زغال اخته حاصل از حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج.

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 5% است.

Yolmeh و همکــاران (2015)، در مطالعــه‌ای بــر روی تــاثیر روش‌های مختلف استخراج بر عصاره آناتو[1] گزارش گردند که عصاره حاصل از روش اولتراسوند توانایی بالاتری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به روش استخراج مرسوم نشان داده است که مشابه این پژوهش می‌باشد. نتایج مطالعه Ling و همکاران (2009)، بر روی برگ‌های انبه نشان داد که بالاترین مقدار ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای مهارکنندگی رادیکال آزاد در عصاره اتانولی و کمترین برای عصاره آبی بوده است این محققان مقدار IC50 برای فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره‌ها را در محدوده 0/02 تا 0/49 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که کمتر از نتایج حاصل از این مطالعه است. Rezaeizadeh و همکاران (2011)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و کلروفرمی گیاه موموردیکا کرنشا[2] را بررسی کردند این محقان افزایش درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در عصاره متانولی نسبت به کلروفرمی را به افزایش در مقدار ترکیبات فنولی در آن‌ها نسبت دادند و بیان کردند که یک رابطه خطی بین مقدار کل ترکیبات فنولی و توانایی مهارکنندگی DPPH وجود داشت که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

قدرت احیا کنندگی آهن III

قدرت احیاکنندگی عصاره‌ها، توانایی آن‌ها را برای احیای آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی نشان می‌دهد. حضور آنتی‌اکسیدان‌ها (احیاکننده‌ها) در عصاره که دهنده الکترون هستند منجر به احیای کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آن‌ها به فرم فروس می‌شود که بسته به احیاکنندگی عصاره‌های مورد آزمایش، رنگ زرد محلول به درجات مختلفی از رنگ سبز و آبی تغییر می‌کند (Do *et al.*, 2013). شکل 4، مقایسه میانگین مقدار قدرت احیاکنندگی عصاره آبی، الکی و هیدروالکلی حاصل از روش‌های استخراج اولتراسوند و غرقابی را در غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که عصاره‌های مختلف از نظر قدرت احیاکنندگی، اختلاف معنی‌داری (P0<0/05) با یکدیگر دارند. همانطور که در شکل4 مشاهده می‌شود با افزایش غلظت عصاره در همه روش‌ها، قدرت احیاکنندگی افزایش می‌یابد. مطابق شکل 4، بیشترین قدرت احیاکنندگی متعلق به عصاره حاصل از روش اولتراسوند-آب- اتانول (50:50) است که بالاترین غلظت ترکیبات فنولی را داشته است و کمترین قدرت احیاکنندگی در عصاره‌های آبی بوده است. همچنین با توجه به شکل4، قدرت احیاکنندگی عصاره‌های اتانولی نسبت به آبی و عصاره‌های حاصل از روش اولتراسوند نسبت به غرقابی، بالاتر می‌باشد. بر اساس یافته‌های این تحقیق، نمونه‌های حاوی ترکیبات فنولی بالاتر، قدرت احیاکنندگی بالاتری هم داشته‌اند. ترکیبات فنولی عصاره‌ها می‌توانند با اهدای الکترون یا اتم‌های هیدروژن، واکنش‌های زنجیری رادیکال‌های آزاد را شکسته و اکسایش را به تاخیر می‌اندازد، وجود عوامل احیاکننده عامل اصلی قدرت احیاکنندگی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از طریق شکستن واکنش زنجیری رادیکال آزاد انجام می‌دهند (دولت‌آبادی و همکاران، 1393). Sultana و همکاران(2009)، با بررسی قدرت احیاکنندگی عصاره گیاهان دارویی (برگ و ریشه گیاه مورینگا الیفرا[3]، پوست گیاهان یوجینیا جامبلانا[4]، اکیشا نایلوتیکا[5]، ازادیراچتا ایندیکا[6] و ترمینلیا آرجونا[7]، میوه فیکس ریلیجیاسا[8] و برگ گیاه الوئه باربدنسس[9]، بیان نمودند خاصیت احیاکنندگی در عصاره‌های حاصل از حلال‌های آلی آبی (اتانول- آب80% و متانول-آب 80%) نسبت به حلال اتانول و متانول خالص بیشتر بود و در عصاره‌های گیاهی با بالاترین سطح فنول، بالاترین قدرت احیاکنندگی وجود داشت که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. Nantitanon و همکاران (2010)، در پژوهشی بر روی عصاره برگ گیاه گاوا[10]، گزارش کردند که عصاره استخراج شده با روش اولتراسونیک عملکردی بهتری در استخراج ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به عصاره حاصل از روش ماسراسیون و سوکسله داشت که مشابه نتایج این مطالعه است. Odabasoglu و همکاران (2005)، در مطالعه‌ای بر روی گونه‌های گیاه لیچن[11]، نشان دادند که با افزایش مقدار ترکیبات فنولی در عصاره‌های آبی این گیاه در محدوده 9/2 تا 61/7 و عصاره‌های متانولی در محدوده 18/6 تا 75/1 میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم، میزان جذب این عصاره‌ها به ترتیب از0/131 تا 0/229 و 0/119 تا 0/542 افزایش یافت که این مقادیر کمتراز نتایج این مطالعه بوده است.

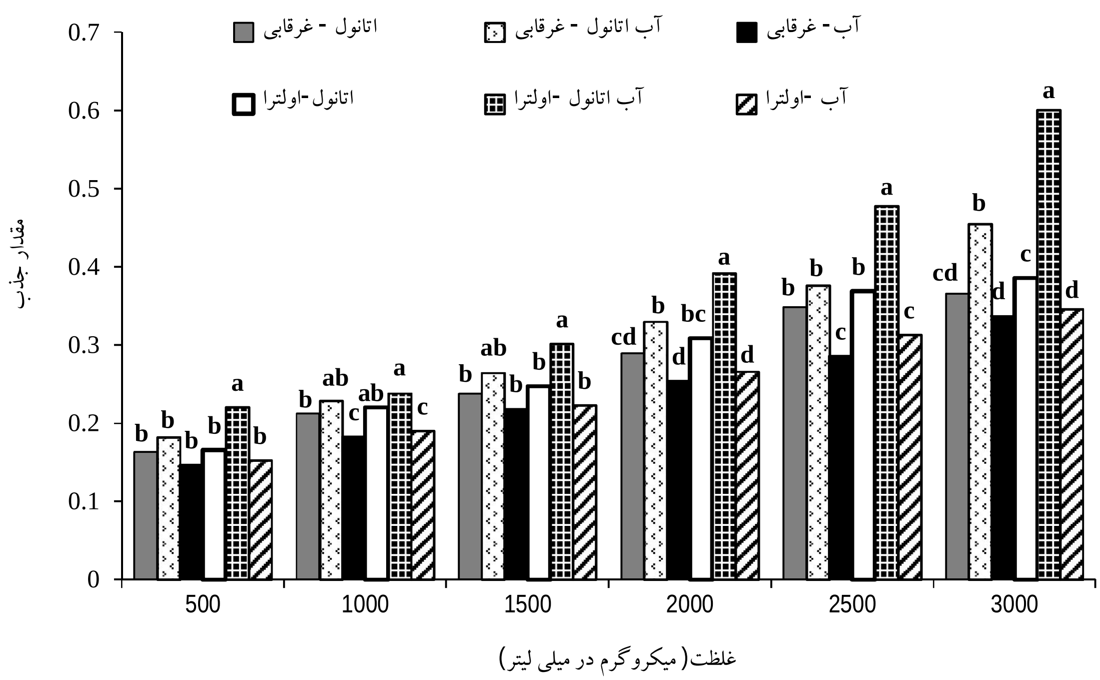
همبستگی بین میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

رابطه میان مقدار ترکیبات فنولی عصاره‌ها با توانایی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در جدول 1 نشان داه شده است. ضریب همبستگی معکوسی بین محتوای فنول با IC50 آن‌ها در آزمون‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد که نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش میزان ترکیبات فنولی است. همچنین همبستگی مثبت و بالایی بین روش‌های سنجش فعالیت

1 Annatto
2 *Momordica charantia*

3 *Moringa oleifera*
4 *Eugenia jambolana*
5 *Acacia nilotica*
6 *Azadirachta indica*
7 *Terminalia arjuna*
8 *Ficus religiosa*
9 *Aloe barbadensisosa*
10 guava
11lichen

آنتی‌اکسیدانی بدست آمد.



شکل4- مقایسه میانگین قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های حاصل از حلال‌ها و روش‌های مختلف استخراج.
حروف غیرمشابه در هر غلظت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 5% است.

جدول 1- نتایج آنالیز همبستگی بین آزمون‌های مختلف ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

نوع آزمون	فنول کل	IC50 مهار رادیکال DPPH	IC50 قدرت احیاکنندگی
فنول کل	1	- 0/975 *	- 0/976*
IC50 مهار رادیکال DPPH	-	1	0/987*
IC50 قدرت احیاکنندگی	-	-	1

*: معنی‌دار بودن همبستگی در سطح احتمال 5% است.

بر اساس نتایج همبستگی در جدول 1 مشخص شد 97 درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال‌های DPPH و قدرت احیاکنندگی مربوط به وجود ترکیبات فنولی می‌باشد. ارتباط ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط Ramli و همکاران (2014) نیز به اثبات رسیده است. Anokwuru و همکاران (2015)، در مطالعه‌ای بر روی سنجش ارتباط بین ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ترمینیلیا سرشیا برچ[12]، گزارش کردند که ارتباط منفی بین میزان فنول با IC50 مهار رادیکال‌های DPPH (r= –0/209) و قدرت احیاکنندگی (r= –0/477) و ارتباط مثبت (r= 0/477) میان آزمون‌های DPPH و قدرت احیاکنندگی وجود داشت که مشابه نتایج این پژوهش است. مقدار تاثیر ترکیبات فنولی در بازداری رادیکال آزاد و فعالیت احیاکنندگی توسط این محققان، 47 درصد گزارش شد که کمتر از نتایج این پژوهش بود. بدین ترتیب نتایج این بررسی نشان داد که میوه زغال اخته به واسطه داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فنولی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالایی است

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که میوه زغال اخته حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی با قدرت آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند به‌عنوان منبع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد استفاده قرار گیرد. براساس نتایج حاصل از این تحقیق، مخلوط حلال قطبی و

12 Terminalia sericea burch

غیرقطبی تاثیر بهتری در استخراج ترکیبات فنولی نسبت به هر یک از حلال‌ها به تنهایی داشته است و استخراج با روش اولتراسوند علاوه بر کوتاه کردن زمان استخراج، در میزان استخراج ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های زغال اخته نسبت به روش غرقابی برتری داشته است و با افزایش میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها، خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها افزایش یافت.

منابع

دولت‌آبادی، م.، رفتنی‌امیری، ز. و اسماعیل‌زاده‌کناری، ر.، 1393، مقایسه فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی پوست سبز گردوی سه منطقه از شمال ایران (شاهرود، بندرگز و هزارجریب)، فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، 45، 193-182.

Ansari, A.Q., Ahmed, S.A., Waheed, S.A., Sayyed Juned, A. 2013. Extraction and determination of antioxidant activity of *Withania somnifera Dunal*. *Journal of Experimental Biology*, 3(5), 502-50.

Anokwuru, C.P., Ramaite, I.D.I., Bessong, P. 2015. Phenolic content distribution and antioxidant activities of Terminalia sericea burch. *Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, 12(4), 21-27.

Charpe, T.W., Rathod, V.K. 2014. Effect of ethanol concentration in ultrasound assisted extraction of glycyrrhizic acid from *Licorice* root. *Journal of Chemical Engineering*, 11(4), 21-30.

Delfanian, M., Esmaeilzadeh Kenari, R., Sahari, M.A. 2015. Influence of extraction techniques on antioxidant properties and bioactive compounds of loquat fruit (*Eriobotrya japonica Lindl*.) skin and pulp extracts. *Journal of Food Science & Nutrition*, 3(3), 179-187.

Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.H. 2013. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and drug analysis*, 1-7.

Dolatabadi, M., Raftani Amiri, Z., Esmaeilzade Kenari, R. 2014. Comparison of total phenols and antioxidant properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk of three regions of northern Iran(Shahrood, Bandar Gaz and Hzargarib). *Journal of Food Science and Technology* , 11(45), 183-192.

Esmaeilzadeh Kenari, R., Mohsenzadeh, F., Raftani Amiri, Z. 2014. Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *Journal of Food Science & Nutrition*, 2(4), 426–435.

Farhoosh, R., Golmovahhed, G.A., Khodaparast, M.H.H. 2007. Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Food chemistry*, 100, 231–236.

Galanakis, C.M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris1, G.A., Gekas, V. 2013. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Journal of Food Properties*, 16, 382–396.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., Juraimi, A.S., Tayebi-Meigooni, A. 2015. Comparative evaluation of different extraction techniques and solvents for the assay of phytochemicals and antioxidant activity of Hashemi rice bran. *Journal of Molecules*, 20, 10822-10838.

Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compound of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Journal of Food chemistry*, 92, 521–525.

Hassanpour, H., Hamidoghli, Y., Hajilo, J., Adlipour, M. 2011. Antioxidant capacity and phytochemical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes in Iran. *Journal of Scientia horticulturae*, 129, 459-463.

Karasakal, A. 2015. Determination of antioxidant activities, total phenolic, flavonoid, anthocyanin, β carotene and lycopene contents, essential and toxic elements in commercial cornelian cherry marmalades. *Journal of Chemistry and Environment*, 19 (5), 67–72.

Ling, L.T., Yap, S.A., Radhakrishnan, A.K., Subramaniam, T., Cheng, H.M., Palanisamy, U.D. 2009. Standardised Mangifera indica extract is an ideal antioxidant. *Journal of Food Chemistry*, 113, 1154–1159.

Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., Okonogi, S. 2010. Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. Journal of LWT - Food Science and Technology, 43, 1095-1103.

Narimani-Rad, M., Lotfi, A., Mesgari Abbasi, M., Abdollahi, B. 2013. The Effect of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) extract on serum ghrelinand cortico sterone levels in rat Model. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(12), 7-9.

Nazir, A., Wani, S.M., Gani, A., Masoodi, F.A., Haq, E., Mir, S.A., Riyaz, U. 2013. Nutritional, antioxidant and antiproliferative properties of persimmon (*Diospyros kaki*) -a minor fruit of J&K India. *Journal of Advanced Research*, 1(7), 545–554.

Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., Halici, M. 2005. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Journal of Fitoterapia*, 76, 216–219.

Pawlowska, A.M., Camangi, F., Braca, A. 2010. Quali-quantitative analysis of flavonoids of Cornus mas L. (*Cornaceae*) fruits. *Journal of Food Chemistry*, 119, 1257–1261.

Ramazan, M, Pinar, I., Havser, E.V. 2011. Antioxidant activity and total phenolic content of *Gagea fibrosa* and *Romulea ramiflora*. *Iran. J. Chem. Chem. Eng*, 30(3), 57-62.

Ramli, N.S, Ismail, P., Rahmat, A. 2014. Influence of conventional and ultrasonic-assisted extraction on phenolic contents, betacyanin contents, and antioxidant capacity of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Journal of The Scientific World*, 1-7.

Rezaeizadeh, A., Zuki, A.B.Z., Abdollahi, M., Goh, Y.M., Noordin, M.M., Hamid, M., Azmi, T.I. 2011. Determination of antioxidant activity in methanolic and chloroformic extracts of *Momordica charantia*. *Journal of Biotechnology*, 10(24), 4932-4940.

Rouhani, S.H., Alizadeh, N., Salimi, S.H., Haji-Ghasemi, T. 2009. Ultrasonic assisted extraction of natural pigments from rhizomes of *curcuma longa* L. *Journal of Prog. Color Colorants* Coat, 2, 103–113.

Stankovic, M.S., Niciforovic, N., Topuzovic, M., Solujic, S. 2011. Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium Montanum* L. Var. *Montanum*, F. *Supinum* (L.) REICHENB. *Journal of Biotechnol. & Biotechnol*. Eq, 25(1), 2222-2227.

Stankovic, M.S., Zia-Ul-Haq, M., BojoviC, B.M., TopuzoviC, M.D. 2014. Total phenolics, flavonoid content and antioxidant power of leaf, flower and fruits from cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Journal of Agricultural Science*, 20 (2), 358-363.

Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidantactivity of selected medicinal plant extracts. *Journal of Molecules*, 14, 2167-2180.

Sun, C., Wu, Z., Wang,Z., Zhang, H. 2015. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant pro perties of Beijing Propolis extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-10.

Sushma, R., Dharini, H., Sadiya, T., Krishna, M.T.P., Bhavya, S.G., Dammalli, M. 2014. Extraction of polyphenols from Decalepis hamiltonii Root: Optimization Of batch extraction process parameters. *Journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, 5(4), 624–632.

Tural, S., Koca, I. 2008. Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. *Journal of Scientia Horticulturae*, 116, 362-9.

Yolmeh, M, Habibi-Najafi, M.B., Shakouri, S., Hosseini, F. 2015. Comparing antibacterial and antioxidant activity of annatto dye extracted by conventional and ultrasound-assisted methods. *Journal of Research in Medical Sciences*, 15, 29-33.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 4, Oct- Nov 2017, p. 517-527

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 4، مهر - آبان 1396، ص. 527-517

The effect of different solvents and ultrasound on antioxidant properties of extract of *Cornus mas* L. fruit

F. Gillani[1], Z. Raftani Amiri[2*], R. Esmailzadeh Kenari[2]

Received: 2016.02.09
Accepted: 2016.07.10

Introduction: Cornelian cherry (*Cornus mas* L.), which belongs to the family Cornaceae, grows in Iran, in areas such as Qazvin and Arasbaran. The fruit possesses anti-inflammatory and antioxidant properties and it is used as an herbal remedy in medicine. Separation of natural antioxidant compounds from plant sources requires an appropriate method of extraction, which is effective factor to achieve the higher efficiency of these valuable compounds. In this study, the effect of extraction methods (immersion and ultrasound) and different solvents (ethanol 100%, ethanol – water (50:50 V/V) and water) on amount of phenolic compounds and antioxidant properties of cornelian cherry fruit extract were investigated.

Materials and Methods: Qazvin cornelian cherry was purchased from the local market of Amol city, Mazandaran province, Iran. All solvents and chemicals used in this study were of analytical reagent grade and were prepared from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Cornelian cherry was washed, core separated, dried in front of the sun for 5 days and then powdered with kitchen miller. Powdered cornelian cherry fruit was extracted using immersion extraction techniques, ultrasound and different solvents (ethanol 100%, ethanol –water (50:50 V/V) and water). In the immersion method, powdered cornelian cherry fruit were mixed with each solvent in the ratio of 1:10, individually. Then, the mixtures were shaken overnight at room temperature. After 24 hrs, the extracts were filtered through Whatman No. 42 filter paper and the solvents were evaporated in an oven at 55°C. In the ultrasound technique, the mixture of powdered samples with any solvent (1:10) was sonicated in an ultrasonic bath for 45 min at 35°C. The extracts were then filtered and the solvents were evaporated using an oven at 55°C. Finally, the extracts obtained from extraction methods were kept in a freezer for furthere experiments. The total phenolic content of the extracts was determined with the Folin-ciocalteau method, briefly, 0.5 mL of cornelian cherry fruit extracts with concentration of 1mg/mL were mixed with 2.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent (previously diluted 10-fold with distilled water) and 2 mL of 7.5% sodium carbonate solution, then the samples were kept for 30 min at room temperature in the dark and at the end the absorbance of the solutions was read at 760 nm. The ability of the extracts to scavenge 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) was determined. 0.3 mL of each extract with a different concentration (500-3000μg/mL) was mixed with 2.7 mL of methanolic solution of DPPH (6×10^{-5} mole/L), then the mixture was shaken vigorously and was placed in the dark for 60 min. Absorbance was recorded at 517 nm. The percentage of the DPPH radical scavenging was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ inhibition of DPPH radical} = [(A_{DPPH} - A_S) / A_{DPPH}] \times 100$$

A_S and A_{DPPH} are the absorbance of the solution the absorbance of the DPPH solution, respectively. Reducing power of extracts on iron ion was measured. 1mL of each extract with a different concentration (500-3000μg/mL) was mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH= 6.6) and 2.5 ml potassium ferricyanide [K3Fe(CN)6] (1%), then the mixture was incubated at 50˚ C for 30 min. After that, 2.5 ml of 10% trichloroacetic acid were added to the mixture, then, was centrifuged at 1000g for 10 min. Subsequently, 2.5 ml of the upper layer solution was mixed with 2.5 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.1% $FeCl_3$. Finally, the absorbance values of the solutions were read at 700 nm.

Results and discussion: The result of this study showed that the type of solvent and extraction method has been effective on amount of phenolic compounds of extracts, and also concentration dependent of phenolic

1and 2. M. Sc. Student and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran
(*Corresponding Author Email: zramiri@gmail.com)

compounds with antioxidant activity was observed in all extracts. The highest amount of phenolic compounds with 142.72 mg/g (based on Galic acid) was observed in sample extract obtained from solvent of water- ethanol (50:50 V/V) employing ultrasound method. Also, this extract with the lowest IC50 value with the amount of 0.955 mg/ml in the DPPH free radical scavenging method and the highest absorption with the amount of 0.601 in the reducing power of Iron III test, the highest antioxidant performance is shown. A negative correlation was observed between the total phenolic content and the IC_{50} value in the methods of measuring the antioxidant activity (DPPH and reducing power), which revealed the higher total phenolic content will give the lower IC50, that means the higher antioxidant activity. The results of present research showed that cornelian cherry fruit is a natural source of phenolic compounds and have considerable antioxidant activity.

Key words: *Cornus mas* L. fruit, Immersion, Ultrasound, Solvent, Antioxidant properties.